

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

提升菌株醋酸耐受性並透過代謝醋酸生產琥珀酸
Increase bacterial acetate tolerance and engineer the acetate
metabolism leading to succinate

計畫編號：NL1060484

受委託機關(構)：逢甲大學

計畫主持人：趙雲鵬

聯絡電話：04-24521048

E-mail address：ypchao@fcu.edu.tw

協同主持人：

研究期程：中華民國 106 年 4 月至 106 年 11 月

研究經費：新臺幣 柒拾柒萬陸仟元

核研所聯絡人員：涂瑋霖

報告日期：106 年 11 月 30 日

目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	3
貳、研究方法與過程.....	8
一、菌株演化.....	8
二、強化基因表現.....	8
三、基因剔除.....	8
四、菌株培養.....	9
參、主要發現與結論.....	10
一、選擇優越大腸桿菌菌株.....	100
二、演化抗醋酸的菌株.....	100
三、檢測演化菌株的特性.....	10
四、強化醋酸代謝路徑之影響.....	10
五、剔除 <i>SDHA</i> 基因之影響.....	102
六、以葡萄糖來演化 BCRC-1-SDH 菌株.....	102
七、以谷氨酸來演化 BCRC-1-SDH 菌株.....	103
八、工程改善演化菌株.....	105
肆、參考文獻.....	17

中文摘要

二氧化碳氣體減量是減緩溫室效應的有效方法，因此使用再生資源來製造取代石油衍生性的產品，可有效降低化石能源的依賴，達到永續發展和改善環境的目的。在本計畫中，我們將運用合成生物學技術來建立生產有用合成物的技術平台，藉以重組細菌的醋酸代謝路徑，以累積生產琥珀酸。

Abstract

To reduce the emission of carbon dioxide is the most effective way to ameliorate the global warming effect. In this context, it is appealing to produce the substitute commodities from renewable resources for the petroleum-based products. This is useful not only for reducing the dependency on fossil fuels and also to achieve the sustainable development and improve the environment. In this study, we propose to develop a technology platform for production of useful chemicals by implementing synthetic biology. By this approach, the metabolic pathways of acetate in microbes are rewired to lead to succinate.

壹、計畫緣起與目的

人類文明社會的昌達發展，生活重度仰賴工業化，導致自然資源迅速枯竭，尤其近年來如大陸、印度、和東南亞國協等大型消費市場的興起，促使民生賴以的化石能源迅速消耗枯竭，且大量使用石化燃料和其衍生物所產生的二氧化碳氣體，引發嚴重的溫室效應，導致地球的氣候丕變和全球的糧食作物欠收；這個結果業已衝擊世界的經濟發展，影響民生層面既深且廣，世界各國面臨如此險峻挑戰，無不競相研擬因應之政策，以勾劃未來能源和資源開發的國家發展藍圖，並制訂「節能減碳，循環經濟」之政策，引導在地產業之未來發展，以達到國家永續發展之目的。

由於人們對於價格低廉的替代性能源和石化衍生產品的需求日益迫切，這股趨勢引發了所謂的「綠色工業革命」，其革命下的產物就是以綠色製程為基礎的產業，其中生物產業被視為綠色工業的代表，生物產業有賴於生物技術為基礎，相對於以化石能源為基礎的化學工業，生物技術可有效降低能源的消耗和汙染的排放，尤其生物技術可利用再生資源，有效降低化石能源的依賴，進而減少造成溫室效應氣體的產生，另外生質能源的利用也可以創造再生能源，並協助解決農業廢棄物的後續處理，達到永續發展和改善環境的目的。再生資源係指以生物質（biomass）為原料，範圍主要包括作物、農林漁牧加工後之廢棄物和工業及都市排放的有機廢棄物，透過生物精煉製程（biorefinery process）可將這些生物質轉化生產替代性能源、取代石油衍生性的產品和新產品，這類新興產業的市場以每年約 15%的速率成長，目前

全球總產值可達千億美元以上。

琥珀酸(succinic acid)是微生物代謝生產的二羧酸中最重要的物質，已經被美國能源部門列為 12 項平台生質化學品之一，極有經濟價值，經由特定的化學反應之後，琥珀酸可轉化成 1,4 丁二醇、順丁烯二酸酐(maleic anhydride)、琥珀酸亞胺、2 -吡咯烷酮、四氫呋喃等，這些化學品可再轉化成許多有用的化學分子，可用以製作生物可分解聚合物、工業溶劑和特用化學品等，運用範圍廣泛且具有極大的商業市場；此外，琥珀酸可直接運用在食品工業上，當作風味添加劑，也可應用在要藥品上，甚至做為界面活性劑等。目前推估琥珀酸和其衍生物的市場可達每年 24.5 萬公噸，而由琥珀酸製備的聚合物產量每年高達 2 千 5 百萬公噸，市場需求量甚為可觀。琥珀酸過去皆由石化產物丁烷轉化而得，目前由微生物醱酵所生成的琥珀酸成本估計為每公斤 0.55-1.1 美元，極具有競爭力，未來若醱酵生產成本可再降低，預期生質琥珀酸將可取代其石油衍生物，因此吸引了世界上有許多知名的大型製造公司躍躍欲試，其中包括日本 Mitsubishi Chemical, 美國 Myriant Technologies , Diversified Natural Products 和 Michigan Biotechnology Institute International, 德國 BASF, 荷蘭 DSM, 以及法國 Roquette 和 BioAmber 等公司。

自然界中有許多微生物具有醱酵生產琥珀酸的能力，最常見的例子如反芻菌 *Actinobacillus succinogenes* 在厭氧醱酵條件下可生產

琥珀酸，目前的研究工作皆著重於此菌株的改質，以便能使用較便宜的碳源來轉化生產琥珀酸，以提高產品的競爭力；反芻菌 *Mannheimia succiniciproducens* 也被普遍研究，由於成功引入了基因工程技術之後，使得該菌株的生理代謝行為漸被解譯，未來頗具開發的潛力；德國 BASF 公司則篩選了一株反芻菌 *Basfia succiniciproducens*，在連續醱酵條件下，由甘油醱酵生產的琥珀酸之產量、轉化率和生產率分別可達 5.21 g/L、1.02 g/g 和 0.094 g/L/h，該製程的產業化仍有段距離；而荷蘭 DSM 及法國 Roquette 合作開發了重組麵包酵母菌，在醱酵 95 小時後，由葡萄糖可轉化生產 43 g/L 琥珀酸，具有產業化開發的潛能；此外，*Corynebacterium glutamicum*、*Zymomonas mobilis* 和 *Yarrowia lipolytica* 也曾被研發來醱酵生產琥珀酸。相較於其他生產菌株，大腸桿菌具有諸多優勢，包括可使用營養基簡單培養、生長快速、具有代謝多種單糖的能力、且可大量表現生產蛋白質，以及可資運用的基因工程和醱酵技術均較成熟，因此改質大腸桿菌來生產琥珀酸便受到研究者的注目。最早的研究是利用基因剔除的大腸桿菌，惟其琥珀酸產量低，後經由一連串的突變篩選，再加上強化菌株之酵素活性，重組大腸桿菌終可生產 1.19 g/L 琥珀酸。另外一個策略則是剔除菌株中與琥珀酸競爭的代謝路徑，結果改質後的大腸桿菌可由葡萄糖醱酵生產 58.3 g/L 琥珀酸，其莫爾轉化率達 0.85(理論值為 2)。此外，其他的研究也試

圖操作葡萄糖的運輸來增加能量的產生，如此可以增進琥珀酸的生成量。再則，結合導引演化的策略，經基因改質的大腸桿菌可進化成琥珀酸生產菌，結果顯示其莫爾轉化率和產量可達 1.2-1.6 和 70-80 g/L。

再生資源中，尤以木質纖維素的蘊藏量最豐，包括農業殘留物如甘蔗渣、稻稈、穀殼、玉米稈等；非糧食作物，如芒草等；木本生物質，如麻瘋樹等；和生物質廢棄物，如蔬菜和水果廢棄物、紙漿廢棄物和都市排放固態廢棄物等。木質纖維素一般組成包含 30-60%纖維素(cellulose)、20-40%半纖維素(hemicellulose)和 10-30%木質素(lignin)。而纖維素是一種由葡萄糖以 β -1,4 糖鍵結(glycosidic linkage)的聚合糖，由於其本身分子和分子間的氫鍵鍵結，以致造成結晶區和非結晶區的結構；半纖維素則是一種由六碳糖和五碳糖所構成的具有複雜分支結構的聚合糖，軟木的半纖維素組成分主要是六碳糖如葡萄糖，而硬木的半纖維素組成分主要是五碳糖如木糖。許多單醣如葡萄糖、蔗糖、木糖、半乳糖、甘油皆曾被研究用來醱酵生產琥珀酸，另也有研究者利用農業廢棄物、加工殘餘物、作物纖維素和半纖維素水解物當作微生物醱酵的料源，透過生物精煉製程將纖維素和半纖維素轉化成琥珀酸。此外，木質纖維素經由氣化製程可轉化成燃料和化學品，或使用化學方法來製備呋喃類產品等，皆具有高經濟效益。除了這些料源，近年來許多研究者

也投入開發 C1 碳源，主要包括二氧化碳、甲烷和甲醇等，例如 *Acetobacterium woodii* 使用二氧化碳為碳源和氫氣為能量來源，醱酵生產醋酸為最終產物；而 *Methanobacterium thermoautotrophicum* 則使用二氧化碳為碳源和氫氣為能量來源來醱酵生產甲烷。就溫室氣體減量議題而言，這些醱酵過程中不會額外產生二氧化碳，因此格外重要；相對地，如三碳以上的碳源經由微生物代謝經過丙酮酸 (pyruvate) 氧化路徑和檸檬酸循環路徑 (citric acid cycle) 後，釋放出二氧化碳，相較於 C1 碳源醱酵，固碳效能顯然不佳。

醋酸是一種十分重要的大宗工業用化學品，現在是採用孟山多製程來大量製備，全球每年產量達 1250 萬公噸，價格約每公斤 13 元。其製備方法是將甲醇和一氧化碳在銻金屬觸媒作用下進行甲醇羰基化；最近，我國已有新的商業製程使用二氧化碳和氫氣來進行甲醇羰基化來製備。對大部分微生物而言，醋酸可作為二碳碳源，醋酸代謝時會啟動細胞內的乙醛酸支路路徑，乙醛酸支路路徑與檸檬酸循環路徑相似，惟其繞過檸檬酸循環路徑中的兩個去羰基化反應步驟，結果醋酸氧化代謝後避免產生二氧化碳。醋酸代謝在大腸桿菌中已經被詳細研究(圖一)，基於醋酸價廉，可由二氧化碳以化學方法或微生物醱酵生成，十分適合當作微生物醱酵料源，以發展生物製程來生產增值性的產品。截至目前為止，仍未有相關醋酸醱酵製程的研究，因此，本計畫主旨將開發大腸桿菌之醋酸醱酵的技

術平台，最終以生產琥珀酸為目標。

貳、研究方法與過程

本期計畫目標將建構一株醋酸醱酵菌，其執行方法及進行步驟分述如下：

一、菌株演化

醋酸可嚴重抑制大腸桿菌的生長和代謝活性，已知醋酸達到 3-5 g/L 時，離子型態醋酸可穿透細胞膜造成細胞內部 pH 值下降和大量陰離子累積，最後破壞細胞膜電位場，以致細胞的呼吸鏈喪失製造 ATP 的功能。因此在此採用化學劑來隨機突變菌株，接著以繼代培養的方式來導引演化大腸桿菌，俾使菌株增強抗醋酸毒性能力或其他特性。

二、強化基因表現

醋酸首先經由代謝成為乙醯輔酶 A，強化基因表現預期可以增進醋酸代謝能力。強化菌株染色體基因的表現，我們將採用原位鑲箱啟動子技術，以便能將人工啟動子與染色體基因黏合在一起，因此將以 PCR 方法增幅這一段基因卡匣，隨之以重組酶作用來移除抗抗生素標誌基因，最後將融合啟動子原位鑲箱在染色體基因的上游，以便達到調控和強化染色體基因表現之目的。

三、剔除基因

為了導引醋酸代謝碳流至琥珀酸，因此將檸檬酸循環路徑中的基因作用的路徑剔除。如上所述，將以 PCR 方法增幅這一段內含抗抗生素基因卡匣，藉由 λ -Red 作用將此基因卡匣鑲插至菌株的目標基因中，隨之以重組酶作用來移除抗抗生素標誌基因，以達到剔除染色體基因之目的。

四、菌株培養

為了初步檢測生產菌的醱酵能力，首先探討基本的礦物培養質配方，其次使用含有醋酸的礦物培養質，以燒瓶來培養生產菌，並隨時間取樣分析細胞生長、醋酸消耗和產物濃度。

參、主要發現與結論

本計畫的初期目標在於開發大腸桿菌醋酸醱酵的技術平台，基於此，以目標為導向進行以下的研究。

一、選擇優越大腸桿菌菌株

醋酸可嚴重抑制大腸桿菌的生長和代謝活性，因此首要之務便是選擇可代謝醋酸的優越菌株。由實驗室中所收集的大腸桿菌(包括 K12、B 和 W 菌種)以燒瓶培養方式來檢測菌株生長的狀況，培養基則採用含 0.6%、1.2%、2.4%、3%醋酸的 M9 礦物基質，圖二顯示 MG1655(K12)菌株在含 0.6%醋酸的培養下的生長狀況極差；當醋酸濃度提升到 3%時，BL21(B)菌株生長狀況明顯受到抑制，而 Nissle 和 BCRC10954(W)的生長仍具有優越性。最後，將此兩菌株培養於含 4%醋酸的基質中，BCRC10954 的生長優於 Nissle，因此選擇 BCRC10954 菌株做後續的研究。

二、演化抗醋酸的菌株

已知過量葡萄糖可造成大腸桿菌生產醋酸，過去有許多研究著眼於發展大腸桿菌醱酵時醋酸的減產方法。醋酸達到 3-5 g/L 時，離子型態醋酸可穿透細胞膜造成細胞內部 pH 值下降和大量陰離子累積，最後破壞細胞膜電位場，以致細胞的呼吸鏈喪失製造 ATP 的功能。因此必須導引突變大腸桿菌，俾使菌株增強抗醋酸毒性能力。由圖二的結果也顯示，BCRC10954 菌株雖然可在含 4%醋酸的基質中生長，不過其生長受到嚴重抑制，也印證了醋酸的毒性。在此採用引導演化的方法來突變改質菌株，初期使用含 3%醋酸的基質來培養 BCRC10954 菌株，24 小時之後，將其轉養於含 3.5%醋酸的基質中，次日再將其轉養於含 4%醋酸的基質中，

此後以此方式繼代培養，經過 10 日後，菌株可於含 4%醋酸的基質穩定且適切的生長(圖三)，隨後由培養液中篩選出菌株(另命名為 BCRC10954-4P)作為後續實驗之用。

三、檢測演化菌株的特性

為了進一步瞭解演化菌株與控制菌株於含不同醋酸濃度基質的生長差異，因此以燒瓶培養方式來檢測菌株生長的狀況，培養基則採用含 1%、2%、3%、4%醋酸的 M9 礦物基質，圖四顯示演化菌株 BCRC10954-4P 在含 1%醋酸培養基的生長較控制菌株 BCRC10954 略差；當醋酸濃度提升至 2-4%時，BCRC10954-4P 菌株的生長狀況明顯優於 BCRC10954，這結果顯示演化菌株 BCRC10954-4P 提升了抗醋酸毒性的能力，不過對於醋酸的親和力(即攝取能力)卻略微降低，值得注意的是，菌株初期代謝醋酸的速率較緩慢，其原因仍不明。

四、強化醋酸代謝路徑之影響

醋酸首先經由代謝成為乙醯輔酶 A，之後採用原位鑲箱啟動子技術將人工啟動子與染色體基因黏合在一起，藉以強化 BCRC10954-4P 菌株的基因表現。藉由同源重組的作用將此基因卡夾鑲插至菌株的基因中後從原位鑲箱後的菌株庫中篩選出一株菌(另命名為 BCRC-1)作為後續實驗之用。

接著，以燒瓶培養方式來檢測菌株 BCRC-1 的醋酸代謝狀況，培養基則採用含 1%醋酸的 M9 礦物基質，隨著培養時間取樣分析，結果如圖五所示，培養 24 小時之後，強化 *acs* 基因的菌株 BCRC-1 可消耗 8.2 g/L 醋酸，而對照菌株 BCRC10954-4P 則可消耗 4.5 g/L 醋酸，這個結果也反映在菌株的生長，菌株 BCRC-1 的生長明顯

優於對照菌株 BCRC10954-4P。

五、剔除基因之影響

為了導引醋酸代謝碳流至琥珀酸，因此將檸檬酸循環路徑中的基因作用的路徑剔除。藉由同源重組的作用將此基因卡夾鑲插至菌株的基因中，以便移除基因的功能。從原位鑲箱後的菌株庫中篩選出一株菌(另命名為 BCRC-1-sdh)作為後續實驗之用。

接著，以燒瓶培養方式來檢測菌株 BCRC-1-sdh 的醋酸代謝狀況，培養基則採用含 1%醋酸的 M9 礦物基質，隨著培養時間取樣分析，結果菌株無法生長。由於基因的功能可提供呼吸鏈的電子傳遞和運輸質子至細胞膜外，推論這是細胞在醋酸代謝中最主要的電子和質子供應者，因此菌株失去基因的功能也將無法有效進行呼吸作用來製造質子運動力(proton motive force)，進而導致菌株無法進行醋酸代謝。有趣的是，喪失基因功能所引致的能源缺狀態，可藉由在培養基中添加酵母萃取粉來解決，如圖六所示，菌株 BCRC-1-sdh 可部分恢復醋酸代謝的能力，而且可以累積產生微量琥珀酸。

六、以葡萄糖來演化 BCRC-1-sdh 菌株

為了導引醋酸代謝碳流至琥珀酸，如上述將檸檬酸循環路徑中的基因作用的路徑剔除，而獲得菌株 BCRC-1-sdh，然菌株卻無法進行醋酸代謝。因此採用導引突變的策略，俾使菌株菌株重拾醋酸代謝的能力。由圖七結果顯示，首先在 1%醋酸的培養基中添加 0.1%葡萄糖以便支持菌株的生長，一週後將葡萄糖的濃度降低至 0.05%，此時菌株的生長也隨之降低，經過兩週後，將葡萄糖完全移除，此時菌株完全倚賴培養基的醋酸作為生長的碳源，在經

過兩週後，菌株的生長逐漸隨著繼代培養的次數也隨之增加，最後達到穩定生長的狀態，隨後由培養液中篩選出菌株(另命名為 BCRC-1-sdh-A1)作為後續實驗之用。

為了進一步瞭解演化菌株 BCRC-1-sdh-A1 的醋酸代謝狀態，因此以燒瓶培養方式來檢測菌株生長的狀況，培養基則採用含 1% 醋酸的 M9 礦物基質，圖八顯示演化菌株 BCRC-1-sdh-A1 可正常代謝醋酸，於 24 小時之後，細胞生長進入停滯生長時期，經由 HPLC 分析，此時殘留醋酸達 2.4 g/L(消耗 7.6 g/L)，不過沒有檢測到有機酸的生成，48 小時之後，醋酸完全代謝完，菌株仍停留在停滯生長時期。這結果顯示雖然演化菌株 BCRC-1-sdh-A1 重拾醋酸代謝的能力，代謝後的碳流向卻不明。

基於以上的結果，推論醋酸代謝後的碳流向可能導向葡萄糖新生路徑(gluconeogenesis)。因此採用休眠細胞(resting cell)的實驗策略來印證這個假設，其做法就是使用起始高細胞密度，如圖九所示，在 48 小時培養期間，對照菌株 BCRC-1-sdh 的細胞密度幾乎維持不變，但只消耗 7.5 g/L 醋酸，同時生產約 0.3 g/L 琥珀酸。另外，實驗菌株 BCRC-1-sdh-A1 的細胞密度隨著時間略微下降，最終幾乎代謝完 20 g/L 醋酸，然卻無累積生成有機酸。以上的結果顯示，實驗菌株 BCRC-1-sdh-A1 可有效代謝醋酸，醋酸代謝後的碳流向並沒有導引至葡萄糖新生路徑，因此推斷可能在檸檬酸循環路徑被完全氧化成二氧化碳，不過這個推論仍須進一步的實驗來印證。

七、以谷氨酸 (Glutamic acid) 來演化 BCRC-1-sdh 菌株

在此仍採用導引突變的策略，俾使菌株菌株重拾醋酸代謝的能

力，不同的是，此次採用谷氨酸做為主要碳源。由圖十結果顯示，首先在 1%醋酸的培養基中添加 0.05%葡萄糖和 1%谷氨酸以便支持菌株的生長，經過 2 日後將葡萄糖完全移除，此時菌株的生長也隨之降低，再經過 10 日後，此時菌株完全倚賴培養基的谷氨酸或醋酸作為生長的碳源，隨之菌株的生長逐漸隨著繼代培養的次數也隨之增加，最後達到穩定生長的狀態，隨後由培養液中篩選出菌株(另命名為 BCRC-1-sdh-G1)作為後續實驗之用。

為了進一步瞭解演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 的醋酸代謝狀態，因此以燒瓶培養方式來檢測菌株生長的狀況，培養基則採用含醋酸/谷氨酸的 M9 礦物基質，圖十一顯示演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 可恢復醋酸代謝，惟速率趨緩，於 24 小時之後，細胞生長仍處於對數生長時期，經由 HPLC 分析，此時殘留醋酸達 2.2 g/L(消耗 2.8 g/L)，不過沒有累積生產有機酸；另外，此菌株也可以代謝谷氨酸，惟生長速率相當緩慢，於 24 小時之後，細胞生長仍處於對數生長時期，此時消耗約 10 g/L 谷氨酸，也沒有累積生產有機酸；最後當使用醋酸和谷氨酸做為碳源時，生長速率相對增快，於 24 小時之後，消耗約 3g/L 醋酸 7.7 g/L 谷氨酸，然卻無累積生產有機酸。這結果顯示雖然演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 重拾醋酸代謝的能力，也具有同時代謝醋酸和谷氨酸的能力，不過代謝後的碳流向卻不明。

基於以上的結果，推論醋酸代謝後的碳流向可能導向葡萄糖新生路徑。因此採用休眠細胞(resting cell)的實驗策略來印證這個假設，其做法就是使用起始高細胞密度，如圖十二所示，在 48 小時培養期間，不管是單獨使用醋酸、谷氨酸或同時使用兩種碳源，

實驗菌株 BCRC-1-sdh-G1 的細胞密度隨著時間略微下降，只有在單獨使用谷氨酸的條件下，可以累積生成 1.6 g/L 琥珀酸。此外，在同時使用兩種碳源的條件下，實驗菌株主要代謝醋酸，其原因不詳。

八、工程改善演化菌株

基於以上的結果，因此將演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 的基因予以剔除，獲得之菌株則使用含醋酸的 M9 礦物基質來培養，結果如圖十三所示，演化菌株在喪失基因功能後無法進行醋酸代謝，因此無法生長。由此推測基因功能在演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 中類似具有基因功能，可將醋酸代謝後的碳流繼續氧化，因此無中間代謝產物如琥珀酸的累積。

基於此，為了使得菌株可累積生產琥珀酸，將演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 的基因予以剔除，獲得之菌株則使用含醋酸/谷氨酸的 M9 礦物基質來培養，結果如圖十四所示，菌株的醋酸代謝優於谷氨酸代謝，惟速率趨緩，於 48 小時之後，幾乎可消耗所有的醋酸或谷氨酸，不過沒有累積生產琥珀酸；當使用醋酸和谷氨酸做為碳源時，生長速率相對增快，於 48 小時之後，卻只消耗約醋酸和谷氨酸各 2 g/L，但是可累積生產 0.2 g/L 琥珀酸。這結果顯示剔除基因後，可以減緩醋酸和谷氨酸代謝後的碳流繼續氧化。此外，將菌株於微溶氧下培養(圖十五)，並以含醋酸(0.5%)/谷氨酸(1%)的 M9 礦物基質來培養，於 48 小時之後，消耗約 3 g/L 醋酸和 4.5 g/L 谷氨酸，並且生產 0.25 g/L 琥珀酸。

最後，再將演化菌株 BCRC-1-sdh-G1 的基因予以剔除，獲得之菌株則使用含醋酸/谷氨酸的 M9 礦物基質來培養，在此採用休

眠細胞(resting cell)的實驗策略來進行測試，結果如圖十六所示，使用起始高細胞密度的情況下，可消耗約 5 g/L 谷氨酸，並分別生產 0.5 和 1.3 g/L 琥珀酸，這顯示剔除基因後可較有效減緩醋酸和谷氨酸代謝後的碳流繼續氧化；在 48 小時之後，兩株菌只代謝些許谷氨酸，尤其剔除基因的菌株只消耗極少量的谷氨酸，最終琥珀酸的產量分別達到 1.8 和 2.2 g/L。

綜合以上所有的結果，可推論醋酸代謝路徑在剔除基因後的大腸桿菌中可能與原本所知的路徑存在極大的差異性，即使在本研究中透由演化方式讓剔除基因後的大腸桿菌重拾醋酸代謝的能力，不過醋酸代謝後的碳流向仍不明，因此不易以代謝工程的策略來控制碳流向，由於本期計畫執行時程短，無法投入詳盡的研究，未來仍需更多的基礎研究來探討。

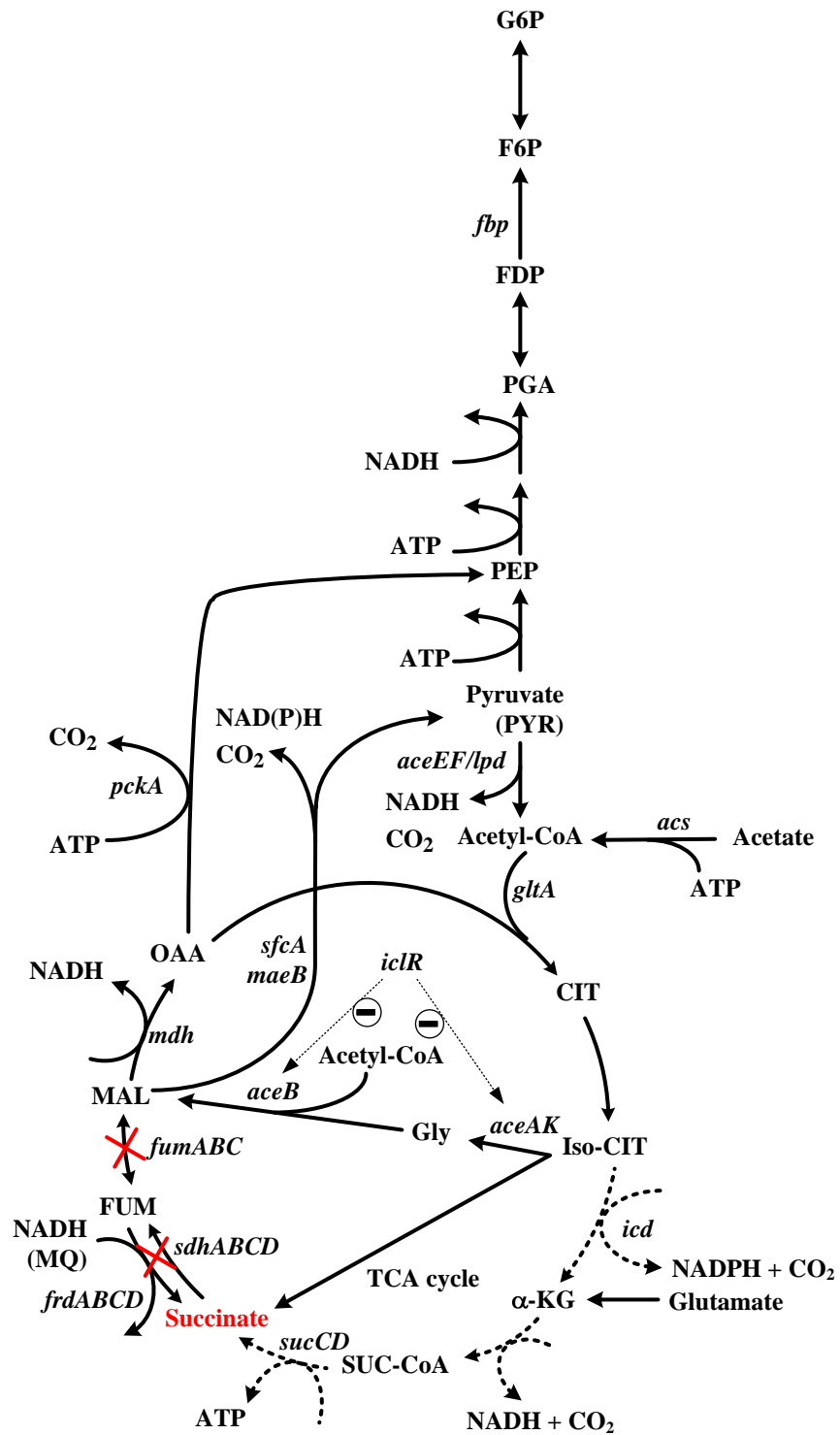
肆、參考文獻

1. Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. 2007. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 23:381-388.
2. Borges ER, Pereira NJ. 2011. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *J Ind Microbiol Biotechnol*:1001-1011.
3. Chen K, Jiang M, Wei P, Yao J, Wu H. 2010. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*. *Appl Biochem Biotechnol* 160:477-485.
4. Chiang CJ, Saini M, Lee HM, Wang ZW, Chen PT, Chao YP. 2012. Genomic engineering of *Escherichia coli* by the phage attachment site-based integration system with mutant loxP sites. *Proc Biochem In Press*.
5. Cox SJ, Shalel LS, Sanchez A, Lin H, Percy B, Bennett GN, San KY. 2006. Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: a succinate production case study. *Metab Eng* 8:46-57.
6. Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:939-1031.
7. Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, Chen MJ, Rathke JW. 1998. A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Appl Biochem Biotechnol* 70-72:187-98.
8. Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant

- strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnol Bioeng 99:1140-1153.
9. Jantama K, Haupt MJ, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO; 2010. Materials and methods for efficient succinate and malate production patent US 2010/0184171 A1.
 10. Kumar R, Singh S, Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol 35:377-391.
 11. Lee KY, Park JM, Kim TY, Yun H, Lee SY. 2010. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. Microb Cell Fact 9:94.
 12. Lee PC, Lee SY, Hong SH, Chang HN. 2003. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. Bioprocess Biosyst Eng. 26:63-67.
 13. Li J, Zheng XY, Fang XJ, Liu SW, Chen KQ, Jiang M, Wei P, Ouyang PK. 2011. A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour Technol 102:6147-6152.
 14. Lu S, Eiteman MA, Altman E. 2009. Effect of CO₂ on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. J Biotechnol 143:213-223.
 15. Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. 2002. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. J Biol Chem 277:13175-83.
 16. Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. 2008. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl Microbiol Biotechnol 81:459-464.

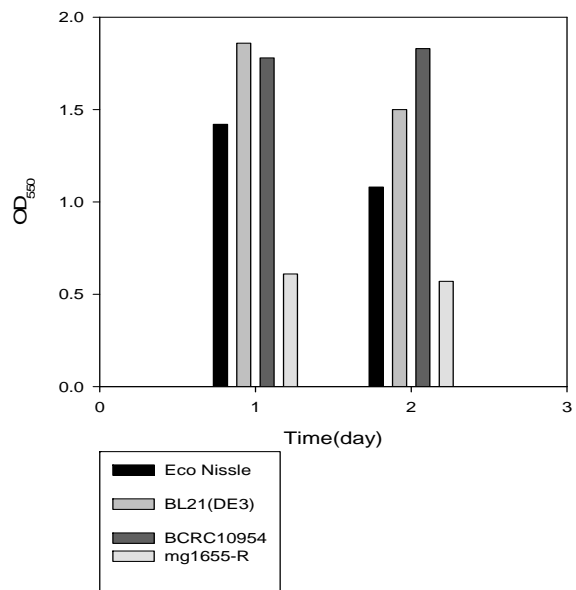
17. Sánchez AM, Bennett GN, San KY. 2005. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng*:229-239.
18. Scholten E, Renz T, Thomas J. 2009. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnol Lett* 31:1947-1951
19. Singh A, Cher Soh K, Hatzimanikatis V, Gill RT. 2011 Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. *Metab Eng* 13:76-81.
20. Stols L, Donnelly MI. 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol* 63:2695-2701.
21. Thakker C, Martínez I, San KY, Bennett GN. 2012. Succinate production in *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 7:213-224.
22. Wang D, Li Q, Li W, Xing J, Su Z. 2009. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 45:491-497.
23. Wang J, Zhu J, Bennett GN, San KY. 2011. Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Metab Eng* 13:328-335.
24. Yuzbashev TV, Yuzbasheva EY, Sobolevskaya TI, Laptev IA, Vybornaya TV, Larina AS, Matsui K, Fukui K, Sineoky SP. 2010. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*. 107:673-682.
25. Zeikus JG, Jain. M.K., Elankovan P. 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:545-552.

附圖

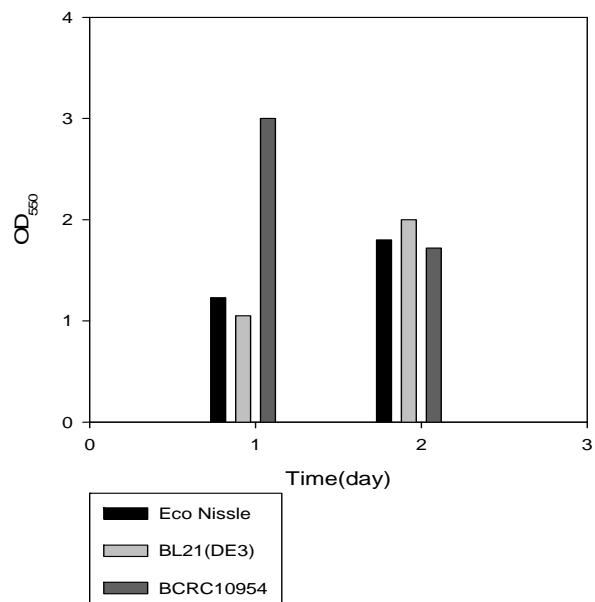


圖一 大腸桿菌之醋酸代謝路徑。

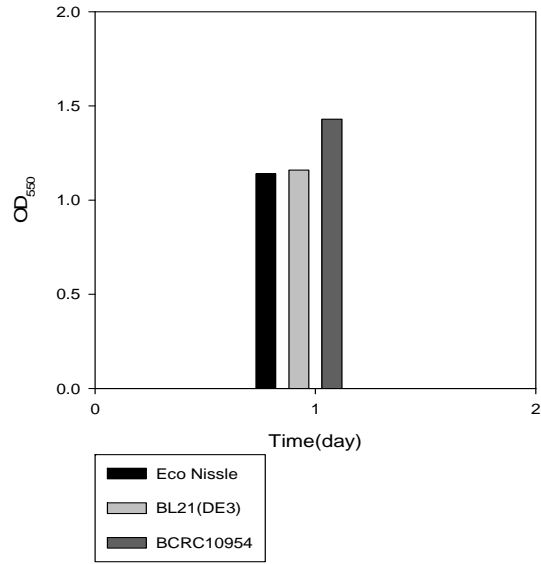
0.6% Acetate



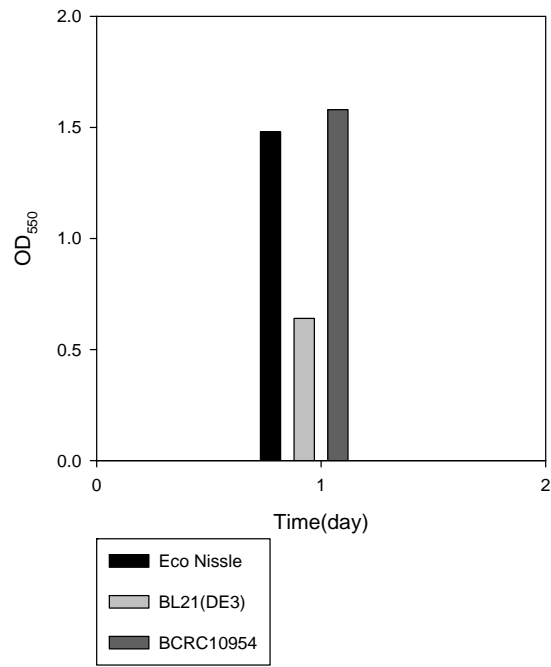
1.2% Acetate

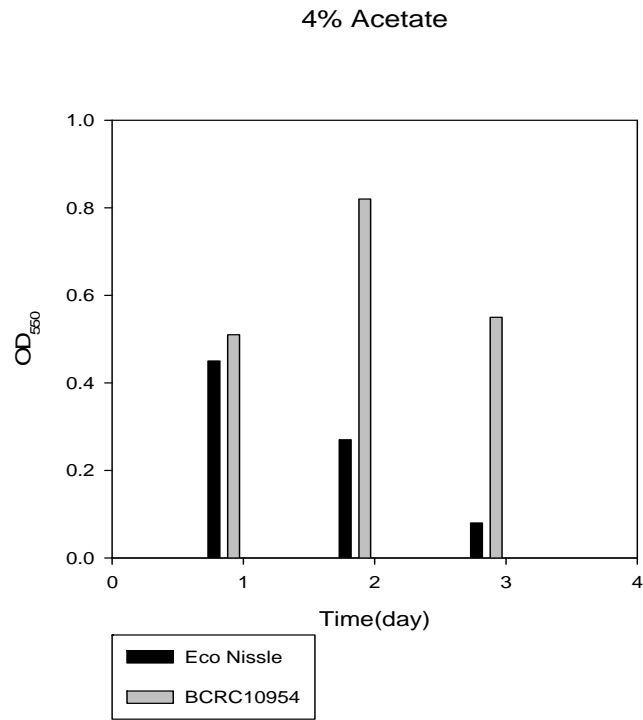


2.4% Acetate

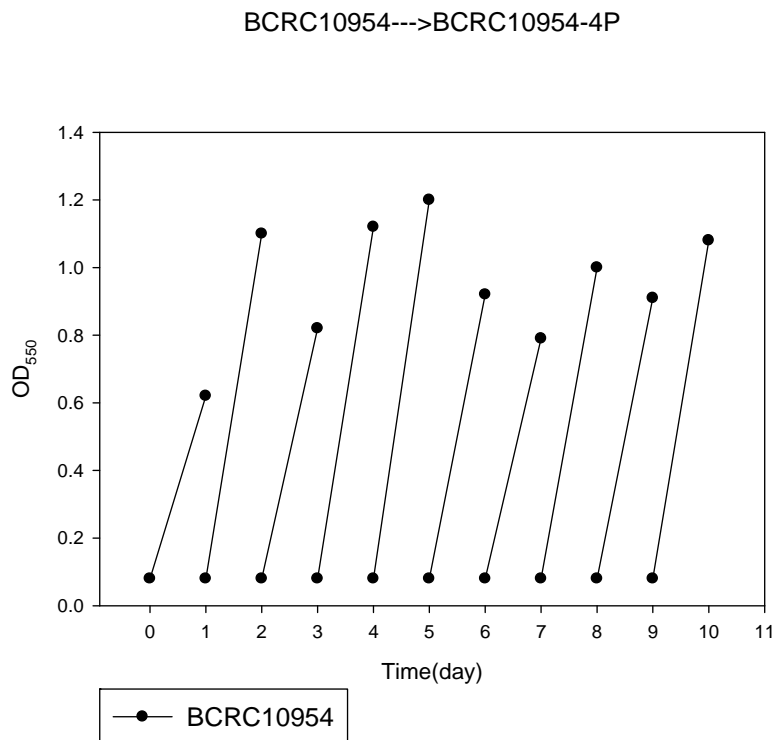


3% Acetate



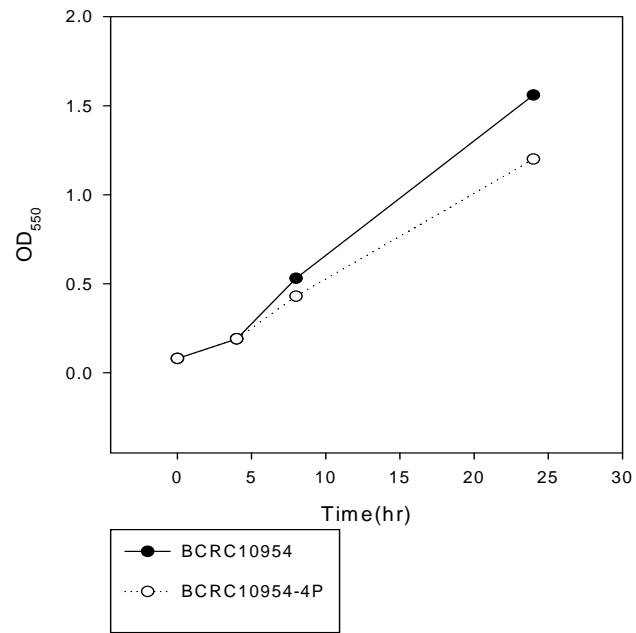


圖二 大腸桿菌菌株於各種醋酸濃度下的生長狀況。

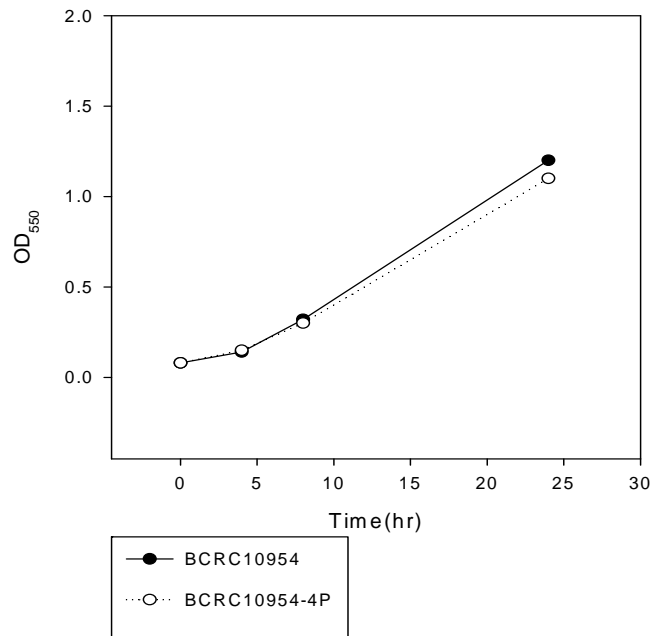


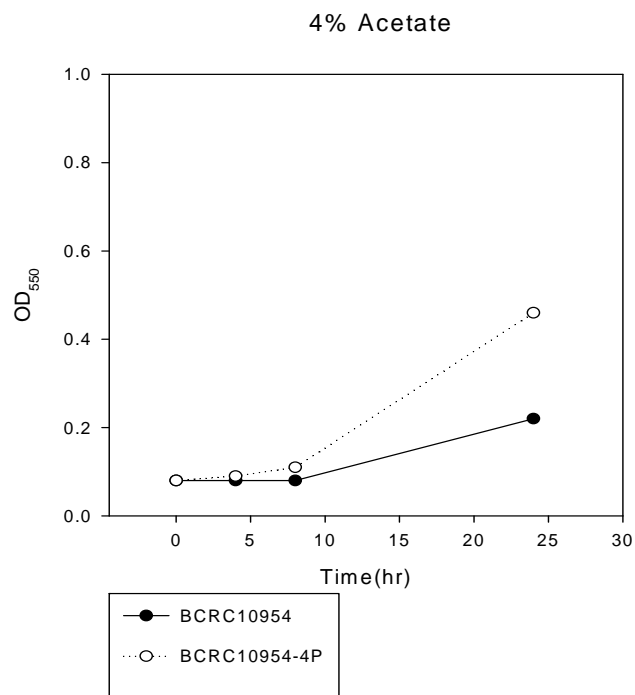
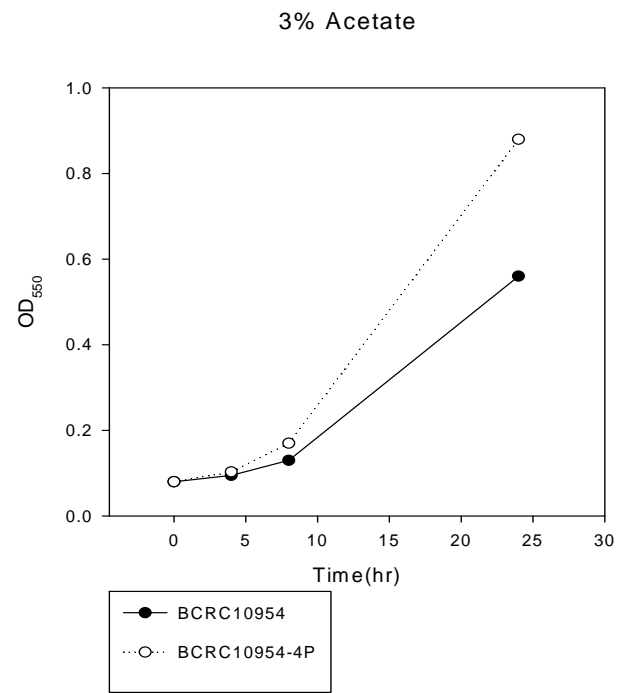
圖三 大腸桿菌菌株之演化進展路徑。在第 2 日的時間點之後，使用含 4%醋酸培養液。

1% Acetate

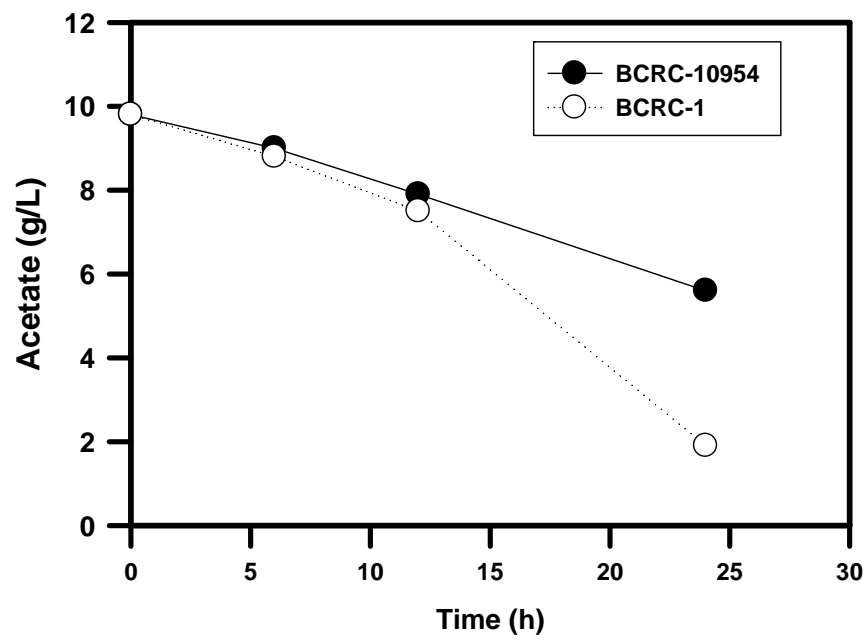
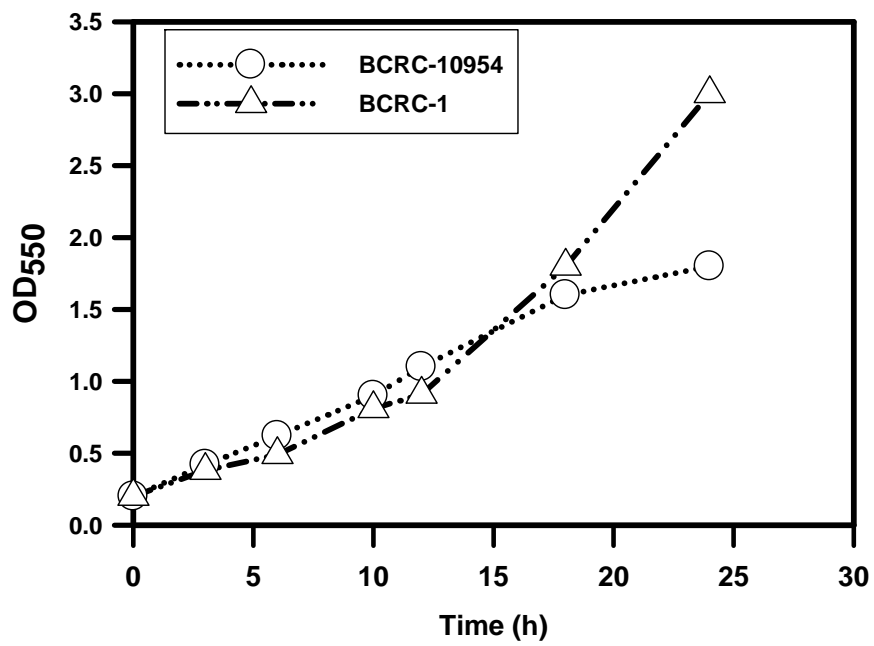


2% Acetate

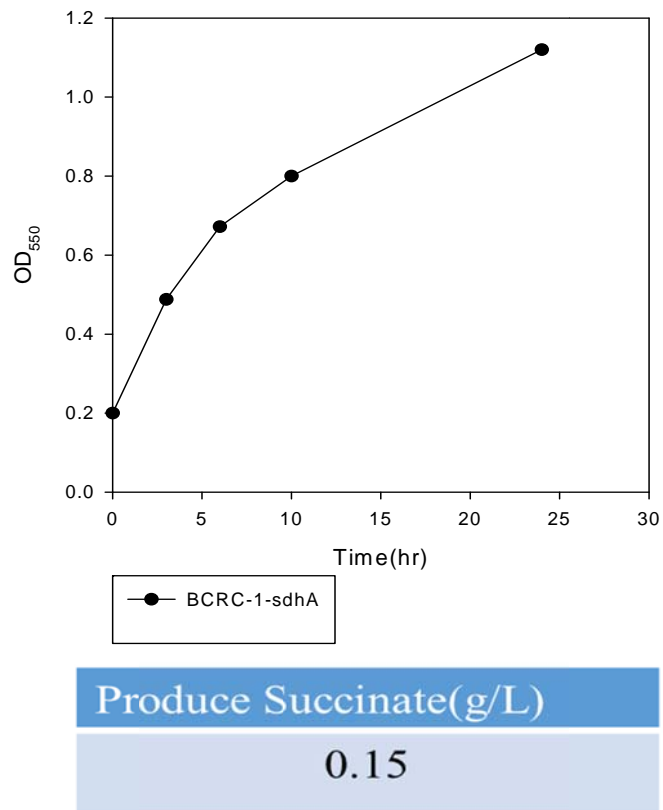




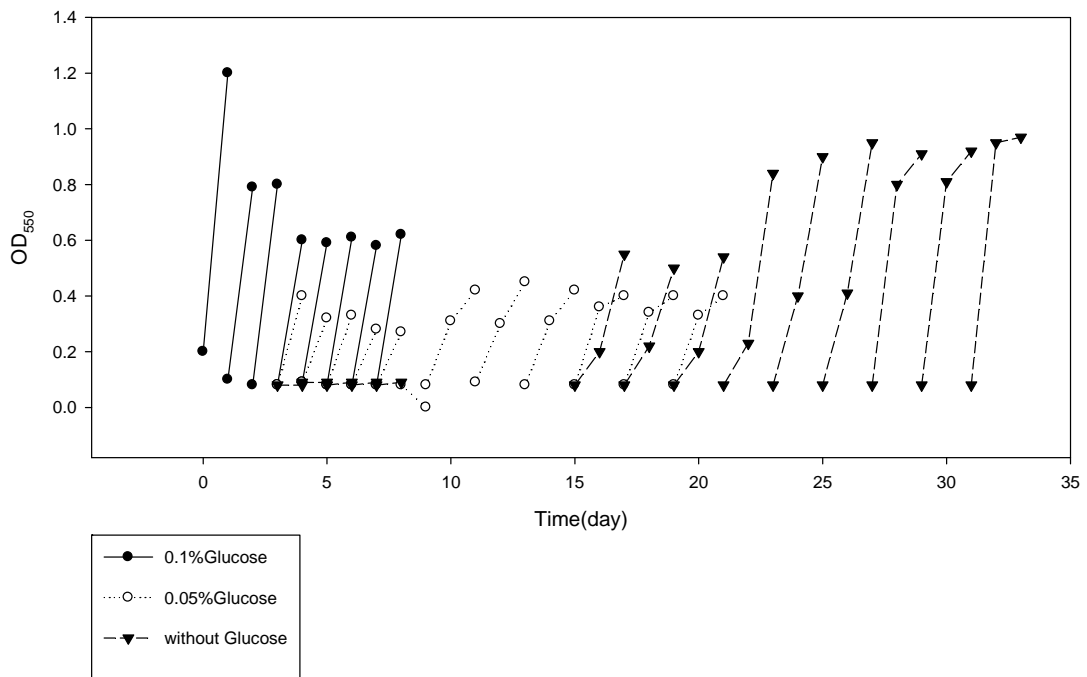
圖四 演化菌株和控制菌株於含不同醋酸濃度基質的生長情形。



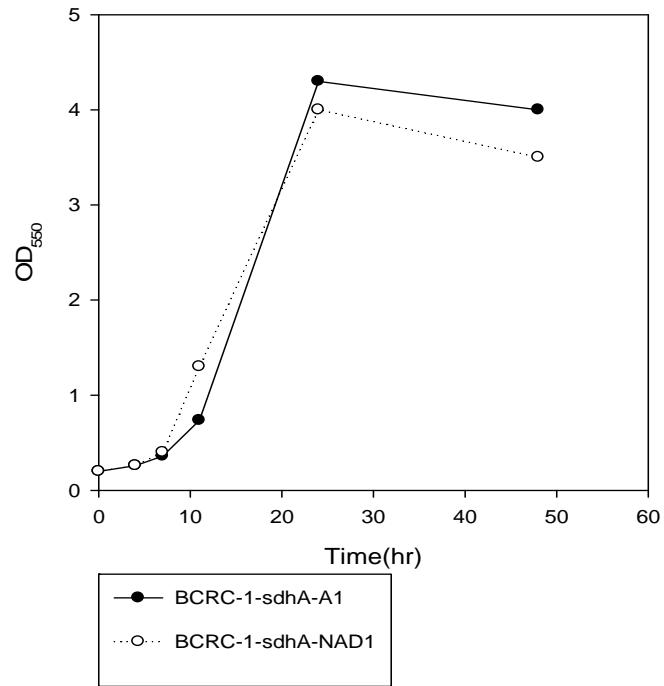
圖五 改質菌株之醋酸代謝情形。



圖六 演化菌株於含醋酸基質的代謝情形。

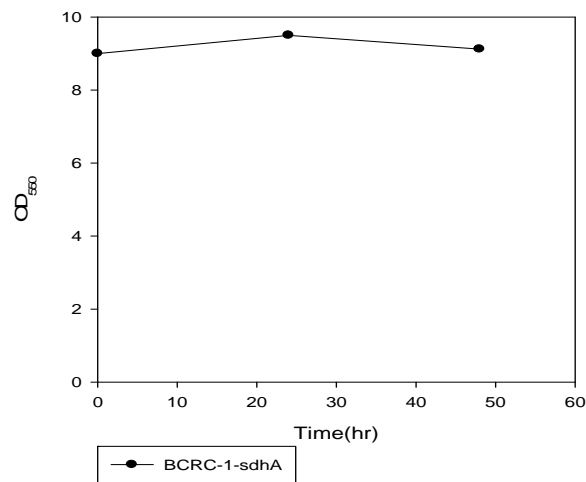


圖七 大腸桿菌菌株之演化進展路徑。首先在培養基中添加葡萄糖以便支持菌株的生長，隨後逐漸降低葡萄糖的濃度，最後將葡萄糖完全移除。

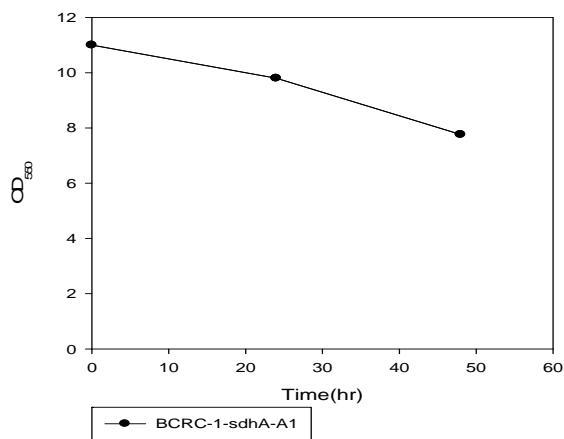


BCRC-1-sdhA-A1	0 HR	24 HR	48 HR
Remaining acetate (g/L)	9.6	2.4	-
Produced succinate (g/L)	-	0	-

圖八 演化菌株於含醋酸基質的代謝情形。

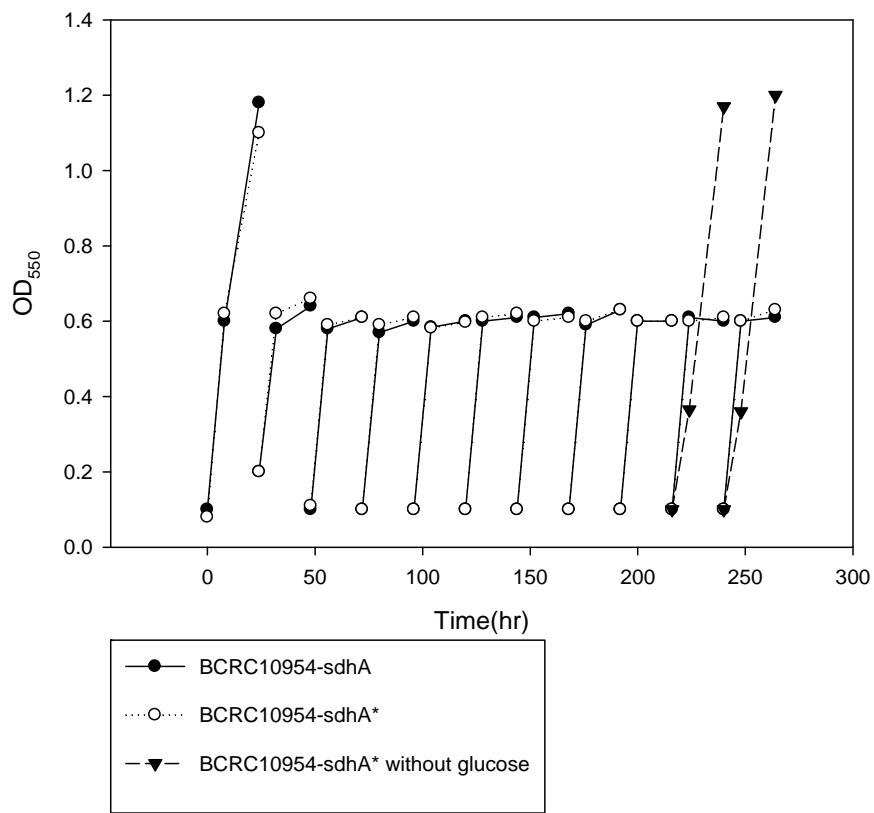


BCRC-1-sdhA	0 HR	24 HR	48 HR
Remaining acetate (g/L)	19.8	16.2	12.47
Produced succinate (g/L)	-	0.28	0.23

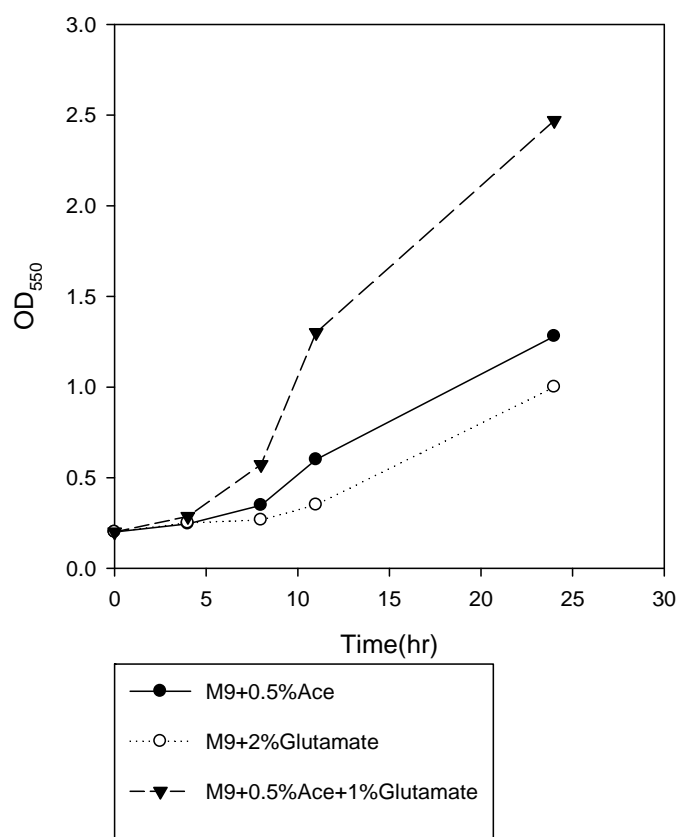


BCRC-1-sdhA-A1	0 HR	24 HR	48 HR
Remaining acetate (g/L)	18.4	2.23	1.25
Produced succinate (g/L)	-	0	0

圖九 休眠演化菌株和控制菌株於含醋酸基質的代謝情形。

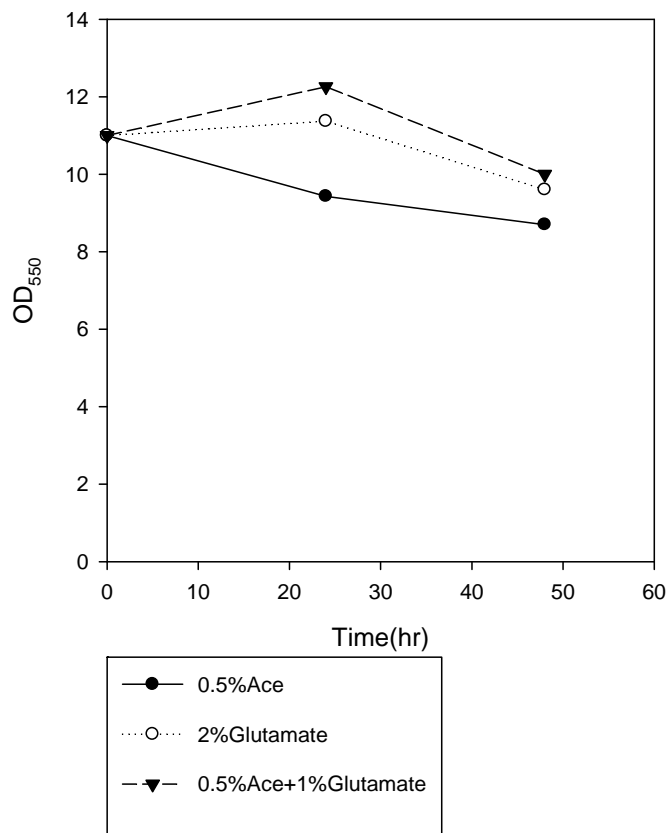


圖十 大腸桿菌菌株之演化進展路徑。首先在培養基中添加葡萄糖和谷氨酸以便支持菌株的生長，隨後移除葡萄糖。



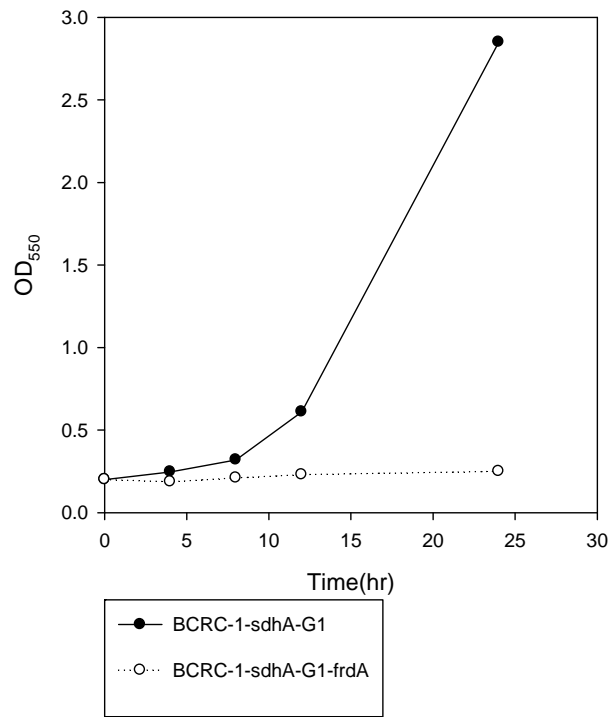
	24 hr Acetate Remaining (g/L)	24 hr Glutamate Remaining (g/L)	Produced succinate (g/L)
0.5%Ace+1%Glutamate	1.87	2.33	0
0.5%Ace	2.16	-	0
2%Glutamate		9.4	0

圖十一 演化菌株於含醋酸/谷氨酸基質的代謝情形。

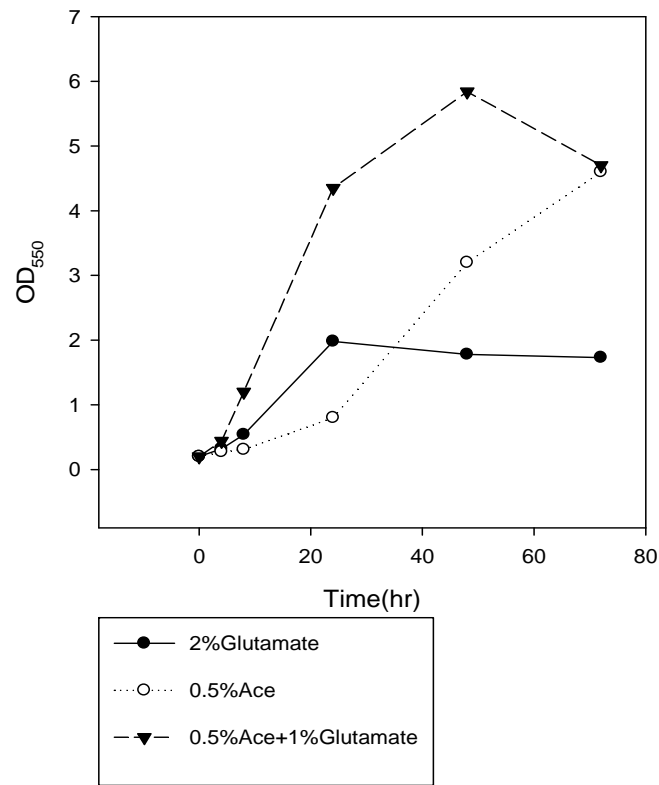


	48 hr Acetate Remaining (g/L)	48 hr Glutamate Remaining (g/L)	48 hr Produced Succinate (g/L)
0.5% Ace + 1% Glutamate	2.9	9	-
0.5% Ace	2.7	-	-
2% Glutamate	-	14	1.46

圖十二 休眠演化菌株於含醋酸/谷氨酸基質的代謝情形。

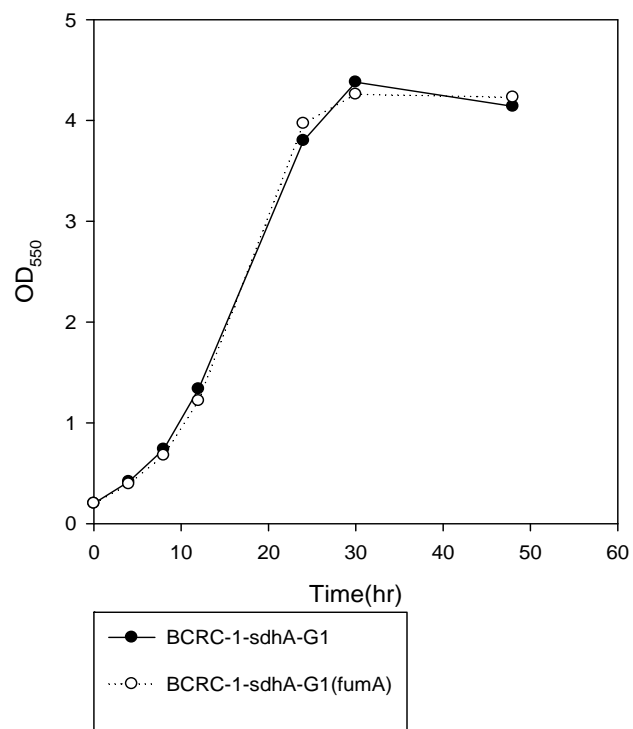


圖十三 演化菌株於含醋酸基質的生長情形。



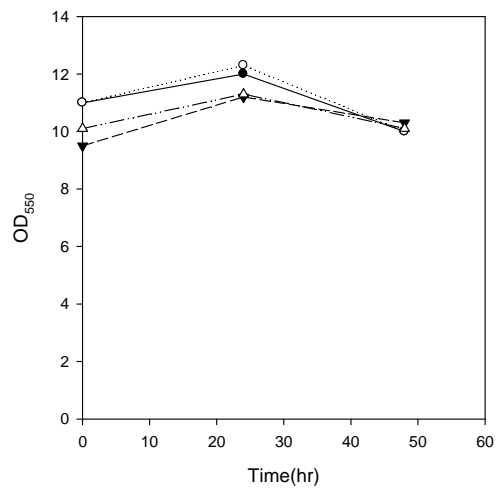
	48hr Acetate Remaining (g/L)	48hr Glutamate Remaining (g/L)	48 hr Produced Succinate(g/L)
0.5% Ace +1% Glu	3.4	8.2	0.18
0.5% Ace	2.8	-	-
2% Glutamate	-	2.5	-

圖十四 演化菌株於含醋酸/谷氨酸基質的代謝情形。



BCRC-1-sdhA-G1(Δ fumA)	24 HR	48 HR
Remaining acetate (g/L)	5	2.26
Remaining glutamate (g/L)	4	5.5
Produced succinate (g/L)	0	0.25

圖十五 演化菌株於微溶氧的代謝情形。



1%Ace+2%Glutamate BCRC-1-sdhA-G1(1)	0HR	24HR	48HR
Remaining acetate (g/L)	9.3	0	0
Remaining glutamate (g/L)	21	15	9.7
Produced succinate (g/L)	-	0.5	1.8

1%Ace+2%Glutamate BCRC-1-sdhA-G1(2)	0HR	24HR	48HR
Remaining acetate (g/L)	9.4	0	0
Remaining glutamate (g/L)	21	15	13
Produced succinate (g/L)	-	1.3	2.2

圖十六 休眠之改善菌株於含醋酸/谷氨酸基質的代謝情形。